

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06025002 A**

(43) Date of publication of application: **01.02.94**

(51) Int. Cl

A61K 35/78

A61K 35/78

A61K 35/78

(21) Application number: **04163312**

(22) Date of filing: **01.06.92**

(30) Priority: **11.05.92 JP 04143681**

(71) Applicant: **TSUMURA & CO**

(72) Inventor: **KAMISHIRO MASAMICHI
FUKUDA KAZUNORI
MIZOGUCHI MITSUJI
OKADA HIDECHIKA**

(54) **APOPTOSIS-INDUCING AGENT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide an apoptosis-inducing agent useful, e.g. as a new type safe anticancer and carcinostatic agent or a medicine for improving many diseases caused by infection with various virus.

CONSTITUTION: This invention provides an apoptosis-inducing agent containing SYOSAIKOTO (a galenical drug composed of radices of Bupleuri, Scutelloria, Daucus, Glycyrrhiza, Zingiber, bulb of Pinella, etc., as the active component. This apoptosis-inducing agent enables

effective apoptosis in a living body. Since the apoptosis is not death of a cell caused by necrosis but death essentially incorporated in the cell itself, unnecessary or pathogenic cells can be naturally removed.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-25002

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	ADU W	7167-4C		
	Q	7167-4C		
	C	7167-4C		
	J	7167-4C		
	M	7167-4C		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-163312

(22)出願日 平成4年(1992)6月1日

(31)優先権主張番号 特願平4-143681

(32)優先日 平4(1992)5月11日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000003665

株式会社ツムラ

東京都中央区日本橋3丁目4番10号

(72)発明者 神代 正道

福岡県福岡市中央区伊崎6-1

(72)発明者 福田 一典

福岡県北九州市小倉北区清水3丁目9-17

(72)発明者 溝口 充志

福岡県久留米市東櫛原2203-1 グラン櫛原403

(72)発明者 岡田 秀親

福岡県福岡市城南区干隈1丁目5番1号

(74)代理人 弁理士 小野 信夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 アポトーシス誘起剤

(57)【要約】

【構成】 小柴胡湯を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤。

【効果】 本発明の、アポトーシス誘起剤によれば、生体内で有効にアポトーシスを引き起こすことが可能となる。このアポトーシスは壊死に基づく細胞の死と異なり、細胞自身に本来組み込まれている死であるため、自然な形で不要もしくは病原細胞を取り除くことができるものである。従って新しいタイプの安全な制癌・抗癌剤や、各種ウイルス感染が原因である多くの病気の治療剤等として有用なものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 小柴胡湯を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、制癌剤、抗ウイルス剤等の医薬として利用可能なアポトーシス誘起剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞壊死) という様式が見出され注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組み込まれている死であると考えられている。

【0003】 すなわち、なんらかの外部的または内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を元にプログラム死タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要もしくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。しかしながら、現在までアポトーシスを導く化合物として知られているものはグルココルチコイドだけであり、より優れたアポトーシス誘起作用を有する化合物の開発が求められていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、アポトーシス誘起作用をもつ化合物を見出だすべく、特に各種生薬について検索していたところ、小柴胡湯が優れたアポトーシス誘起作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は小柴胡湯を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤を提供するものである。

【0007】 本発明において有効成分として用いられる小柴胡湯は、柴胡、半夏、黄芩、大棗、人参、甘草および生姜などの生薬を含む漢方薬であり、抗炎症作用、細胞膜の安定化作用、抗アレルギー作用、免疫賦活作用による各種慢性肝疾患の治療に用いられているものである。

【0008】 この小柴胡湯は、若干の異同があるが、一般に次の配合範囲のものである。

柴 胡	4.0～7.0
半 夏	4.0～5.0
黄 芩	3.0

大 棗 2.0～3.0

人 参 2.0～3.0

甘 草 2.0

生 姜 1.0～4.0

【0009】 本発明のアポトーシス誘起剤は、上記配合の小柴胡湯をそのまま、もしくはその抽出物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組み合わせ製剤化すれば良い。

【0010】 小柴胡湯の抽出物としては小柴胡湯の各種水系溶剤抽出物が挙げられるが、水抽出物を用いることが好ましい。具体的な、小柴胡湯抽出物の調製例としては上記組成の小柴胡湯を10倍量の熱水で抽出し、得られた抽出液を濾過する方法が挙げられる。この抽出物は必要に応じて乾燥させ、乾燥粉末とすることもできる。

【0011】 本発明のアポトーシス誘起剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

【0012】 医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また、経口剤の調製にあたっては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することができる。これらの具体例としては、以下に示すものが挙げられる。

【0013】 (結合剤) デンプン、デキストリン、アラビアゴム末、ゼラチン、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール。

【0014】 (崩壊剤) デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース。

【0015】 (界面活性剤) ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ポリソルベート80。

【0016】 (滑沢剤) タルク、ロウ類、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ポリエチレングリコール。

【0017】 (流動性促進剤) 軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム。

【0018】 また、経口用の液剤として、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤とすることができ、これらの各種剤型には矯味、矯臭剤、着色剤を配合

しても良い。

【0019】一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である小柴胡湯もしくはその抽出物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

【0020】このアポトーシス誘起剤の投与量は、投与経路、疾患の程度、被投与者の年齢等によって異なるが、一般には経口投与の場合、大人1日当たり小柴胡湯乾燥エキス量として1～10g程度となる量を1～3回に分けて投与すれば良い。

【0021】なお、本発明で用いる小柴胡湯はすでに漢方薬として長い歴史を有し、安全性が確認されたものであるので安心して使用することができる。例えば、マウスおよびラットに対し、投与限界である15g/kgの経口投与で死亡例が認められないことから明らかなように極めて安全性の高いものである。

【0022】

【実施例】次に試験例および実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等になんら制約されるものではない。

【0023】試験例 1

下記方法により、小柴胡湯のアポトーシス誘起作用を調べた。

(1) 小柴胡湯添加培地の調製：細胞培養の基礎培地としては、ダルベッコ変法イーグル培地に5%の牛胎児血清、ペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシ(100μg/ml)を加えたものを用いた。同培地に、小柴胡湯(TJ-9、株式会社ツムラ製)のエキス原末を10mg/mlの濃度になるように加え、エキス溶液から難溶成分を除いた遠心上清をとり実験に供した。この濃縮培地を、同上の基礎培地で各濃度に希釈して実験に供した。希釈された小柴胡湯添加培地および非添加培地の浸透圧およびpHはヒトの生理的範囲であった。

【0024】(2) 細胞の形態学的変化の検討：KIM-1細胞株(肝細胞癌)およびKMC-1細胞株(肝内胆管癌株)をそれぞれT-75フラスコに5×10⁵個ずつ接種し、24時間基礎培地で培養後、400μg/mlの濃度に調製した小柴胡湯添加培地と交換し、48時間後の細胞の形態学的変化を検討した。すなわち、浮遊してきた細胞を採取し、サイトスピンにてスライドに付着させた後、70%アルコールにて固定し、HE染色を行い、光学顕微鏡下に細胞の形態像を観察した。このうち、KIM-1細胞株についての形態像を図1(写真)に示す。この図から明らかなように、小柴胡湯の存在により、KIM-1細胞株の細胞縮小、核濃縮等が認

められた。

【0025】(3) DNAフラグメンテーションの検討：上記(2)と同様にして浮遊してきた細胞とスクラッパーにて剥いだ固着細胞をまとめて冷PBSで2回洗浄後、これに、10mM トリス(pH 8)、0.1M EDTA、0.5% SDSおよび20μg/ml RNase (シグマ社)の溶液を0.5ml/10⁶細胞となるように加えて37℃で1時間インキュベートし、更に、最終濃度100μg/mlとなるようプロテナーゼK(シグマ社)を加えた後、50℃で3時間インキュベートし、細胞ホモジネートを得た。これより、フェノールクロロホルムにて蛋白を除去し、エタノール沈澱にてDNAを回収した。このDNAをT10E1(10mM Tris-HCl/1mM EDTA)溶液に溶解後、10μgのDNAを0.5μg/mlのエチジウムブロマイドを加えた1.6%アガロースゲルによる電気泳動にて解析した。

【0026】この結果を図2(写真)に示す。図中、Bは、小柴胡湯を作用させたKIM-1細胞株から抽出したDNAを用いた電気泳動の結果を、Aは小柴胡湯を作用させないときの電気泳動の結果を示す(対照)。この結果から明らかなように、小柴胡湯を作用させた場合は約180bpの整数倍でDNAが切断された断片が検出された。

【0027】(4) 結果

アポトーシスに特徴的なものとして、細胞縮小、クロマチン濃縮、核濃縮、細胞断片化等が知られている。また、この断片化により、DNAは180bpの整数倍のオリゴヌクレオソームに切断されることも知られている。上記(2)および(3)の結果は、全てアポトーシスが惹起されたことを示しており、小柴胡湯がアポトーシスを誘起することがこれらの結果から明かとなった。

【0028】試験例 2

ウイルス感染細胞に対する細胞DNA断片化作用の検討：

(試験方法)以下の如くして、小柴胡湯のDNA断片化作用を調べた。ファルコン3084フラスコ(75cm²)に、10%FCS-RPMI1640培地で1×10⁶個/mlに調整したウイルス感染細胞、MT4を20ml取り、これに200mg/ml、100mg/mlおよび40mg/mlの濃度で小柴胡湯エキスを含むDMSO溶液を各100μlずつ添加した。

【0029】炭酸ガス培養器中、37℃で培養を行い、1時間後に10mlを回収して遠心チューブに移し、1000rpmで6分間遠心した。遠心後、上清を捨てて沈澱した細胞を回収した。残りの10mlについては更に2時間培養を続け、上記と同様遠心して細胞を同様に回収した(培養時間3時間)。沈澱した細胞は、それぞれ直ちに凍結し、-80℃でDNA抽出時まで保存した。

【0030】DNAの抽出は、イソquick™(Isquick™;販売元 タネハシ)を用い以下の通り行った。すなわち、凍結保存してあった沈澱細胞を、100μlのリージェント-Aに懸濁した後、100μlのリージェント-1(ライシス・ソリューション)を加えて細胞を溶解した。これに700μlのリージェント-2(エクストラクション・マトリックス)と400μlのリージェント-3(エクストラクション・バッファ)を加え、ボルテックスで攪拌した。

【0031】この混合液を15,000rpmで5分間遠心後、水相を回収し、1/4量のリージェント-4(酢酸ナトリウム溶液)を加え、これに更に同容量のイソプロピルアルコールを加えて軽く攪拌し、DNAを析出させた。DNAを析出させた混合液を15,000rpmで10分間遠心し、上清を除去した後、沈渣のDNAを更に70%エタノールで遠心洗浄した。得られたDNAをドライアップした後、20μlのTEバッファに溶解し、アガロースゲル電気泳動にかけた。電気泳動は、NuSieveアガロースの3%ゲルを用い、100Vで50分間行った。マーカーは、φ×174/HaeIII消化物を用いた。

【0032】(結果)電気泳動の結果を図3(写真)に示す。図中、コード1~6が小柴胡湯を作用させた場合のDNA断片化を示す(コード1:200μg/ml,1時間作用、コード2:500μg/ml,1時間作用、コード3:1000μg/ml,1時間作用、コード4:200μg/ml,3時間作用、コード5:500μg/ml,3時間作用、コード6:1000μg/ml,3時間作用)。

【0033】この結果から明らかなように、ウイルス感染細胞であるMT4(T細胞由来HTLV-感染細胞株)のDNAは、小柴胡湯により200bpの整数倍で断片化が生じており、アポトーシスが惹起されたことが明かとなった。

【0034】実施例 1

小柴胡湯の抽出物の製造例1:柴胡7g、黄芩3g、甘草2g、人参3g、生姜1g、大棗3gおよび半夏5gの混合生薬(小柴胡湯;24g)に240gの精製水を加え、100℃で1時間加熱抽出した。得られた抽出液を濾過後、スプレードライして2.3gの乾燥エキス粉末を得た。

【0035】実施例 2

小柴胡湯の抽出物の製造例2:柴胡7g、黄芩3g、甘草2g、人参3g、生姜1g、大棗3gおよび半夏5gの混合生薬(小柴胡湯;24g)に300gの精製水を加え、100℃で60分間抽出した。得られた抽出液を遠心分離により固液分離し、得られた分離液を50℃以下でスプレードライして4.5gの乾燥エキス粉末を得た。この乾燥エキス中に含まれる主な成分は、グリチルリチン 42.5mg、バイカリン 160mg、サイ

コサボニンb 4.5mgであった。

【0036】実施例 3

小柴胡湯の抽出物の製造例3:柴胡700g、黄芩300g、甘草200g、人参300g、生姜100g、大棗300gおよび半夏500gの混合生薬(小柴胡湯;2.4kg)に24lの精製水を加え、加熱し、100℃になってから1時間抽出した。得られた抽出液を遠心分離にかけ、残渣を分離して溶液20lを得る。

【0037】この溶液を0.3μmのメンブランフィルター(東洋濾紙社製)により無菌清澄濾過する。得られた濾液をダイアフィルターG-10T(バイオエンジニアリング社製;分画分子量10000)を用いて限外濾過する。この限外濾過は、内容積2.0lの容器の下面に直径152mmの膜をセットし、圧力3kg/cm²で行ない、容器内の液が濃縮されるにつれ精製水約2lを添加するというように実施した。この結果、限外濾過液20lを得た。

【0038】実施例 4

顆粒剤の調製:実施例1により調製した小柴胡湯の乾燥エキス粉末200gを乳糖89gおよびステアリン酸マグネシウム1gと混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠し、直径20mm、重量約2.3gのスラッグ錠を作った。このスラッグ錠をオシレーターで粉碎し、整粒後篩別し、粒径20~50メッシュの顆粒剤を得た。

【0039】実施例 5

錠剤の調製:実施例2により調製した乾燥エキス粉末200mgを微結晶セルロース20gおよびステアリン酸マグネシウム5gと混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠して直径7mm、重量225mgの錠剤を製造した。本錠剤1錠中には、小柴胡湯の乾燥エキス粉末を200mg含有する。

【0040】実施例 6

カプセル剤の調製:実施例2により調製した乾燥エキス粉末500mgを硬カプセルに充填し、カプセル剤を調製した。

【0041】実施例 7

注射剤の調製:実施例3で得た限外濾過液20lにアラニン(発熱物質不含)300gを添加、溶解し、凍結乾燥する。この凍結乾燥物を900本のバイアル瓶に分注して注射剤を得た。この注射剤1バイアルには、凍結乾燥物406mgが含まれており、10mlの精製水に容易に溶解した。また、溶解後の注射液は、92%(550nm)の透過度を有しており、日本薬局方の発熱性物質試験法に適合していた。

【0042】

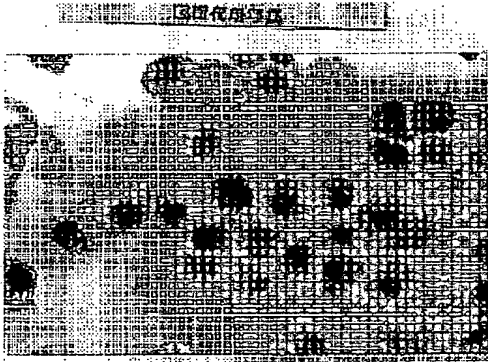
【発明の効果】本発明の、小柴胡湯を有効成分とするアポトーシス誘起剤は、生体内で有効にアポトーシスを引き起こすことが可能となる。このアポトーシスは壊死に基づく細胞の死と異なり、細胞自身に本来組み込まれて

いる死であるため、自然な形で不要もしくは病原細胞を取り除くことができるものである。

【0043】従来、例えば癌に対する制癌剤や抗癌剤としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、DNA合成阻害剤、免疫強化剤等の薬剤が利用されているが、これらのうちアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、DNA合成阻害剤等の薬剤では、癌細胞のみならず正常細胞に対しても影響を及ぼし、副作用が強すぎるという問題があり、また、免疫強化剤では作用が弱いという問題があった。

【0044】しかし、本発明のアポトーシス誘起剤を用いれば、癌細胞にもプログラムされているアポトーシスを引き起こし、不死とされている癌細胞を死滅させるこ

【図1】



とができるので、新しいタイプの安全な制癌・抗癌剤として有利に使用することができる。また、従来排除が困難とされていた種々のウイルスが感染した組織や細胞についてもアポトーシスを引き起こし、これらの組織、細胞を除去することができるので、ウイルス感染が原因である多くの病気の治療等にも有用なものである。

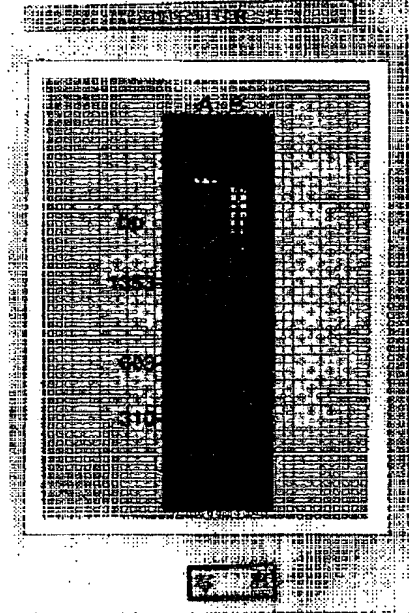
【図面の簡単な説明】

【図1】 小柴胡湯の添加により変化したKIM-1細胞株の形態を示す写真

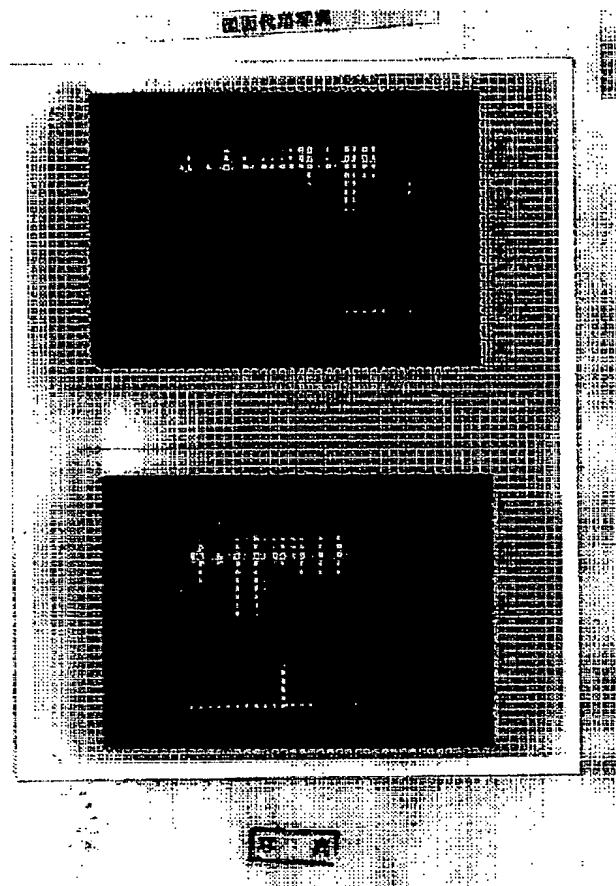
10 【図2】 小柴胡湯の添加により断片化したKIM-1細胞株のDNAを示す写真

【図3】 小柴胡湯の添加により断片化したMT4細胞株のDNAを示す写真

【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成4年7月3日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【従来の技術】近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が見出され注目されている。このアポトーシスは、病的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組み込まれている死であると考えられている。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

A61K 35/78

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

ADY N 7167-4C